

#5

PATENT
Attorney Docket No. 207198

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Saito et al.

Art Unit: Unassigned

Application No. Unassigned

Examiner: Unassigned

Filed: November 3, 2000

For: OIL ADJUVANT VACCINE

JC825 U.S. PRO
09/706301
11/03/00

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

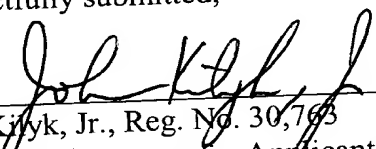
Dear Sir:

Applicants in the above-identified application, through the undersigned attorney, hereby request that the above-identified application be treated as entitled to the right accorded by Title 35, U.S. Code, Section 119, having regard to the application, which particulars are set out below:

In Japan, Application No. 316121/1999, filed November 5, 1999.

A certified copy of the priority document is enclosed.

Respectfully submitted,


John Kityk, Jr., Reg. No. 30,763
One of the Attorneys for Applicant(s)
LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.
Two Prudential Plaza, Suite 4900
180 North Stetson
Chicago, Illinois 60601-6780
(312) 616-5600

Date: November 3, 2000

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

1c825 U.S. PRO
09/706301
11/03/00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 9 年 1 1 月 5 日

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 3 1 6 1 2 1 号

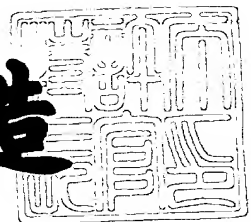
出 願 人
Applicant (s):

財団法人化学及血清療法研究所
日本油脂株式会社

2 0 0 0 年 1 0 月 2 0 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 8 5 8 4 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 A4086

【提出日】 平成11年11月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/39

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県尼崎市南塚口町 2 - 2 0 - 8 - 1 0 1

 【氏名】 齋藤 晃一

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県明石市魚住町錦が丘 1 - 7 - 8

 【氏名】 岸本 洋子

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県菊池郡合志町幾久富 1 8 6 6 - 1 4 4 5

 【氏名】 宮原 徳治

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県菊池郡大津町杉水 3 4 1 0 - 3 0

 【氏名】 高瀬 公三

【特許出願人】

 【識別番号】 000173555

 【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 000004341

 【氏名又は名称】 日本油脂株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100080791

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 高島 一

 【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

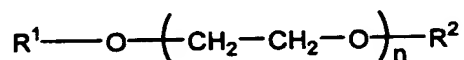
【書類名】 明細書

【発明の名称】 オイルアジュバントワクチン

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 W/O/W型オイルアジュバントワクチンであって、外水相が分子量 400～20,000 の下記一般式 (I) で表されるポリエチレングリコール誘導体を 0.5～20 重量%含有し、且つ内水相が生物学的に許容される有効量の抗原を含有することを特徴とするオイルアジュバントワクチン。

【化 1】



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なっていても良く、水素原子または炭素数 1～4 のアルキル基を表し、 n は重合度を表す。)

【請求項 2】 一般式 (I) で表されるポリエチレングリコール誘導体の分子量が 1,000～10,000 である、請求項 1 に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項 3】 一般式 (I) で表されるポリエチレングリコール誘導体の外水相中の含有量が 1～10 重量%である、請求項 1 に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項 4】 常温で液状を呈する油性成分 (A)、乳化剤 (B) および生物学的に許容される有効量の抗原を含有する水性成分 (C) を含んで調製される W/O エマルションを、乳化剤 (D) および水性成分 (E) を含む液に分散・乳化させることにより調製される W/O/W 型オイルアジュバントワクチンであって、当該液が、分子量が 400～20,000 の一般式 (I) で表されるポリエチレングリコール誘導体を 0.5～20 重量%含有する、請求項 1 に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項 5】 常温で液状を呈する油性成分 (A)、乳化剤 (B) および生物学的に許容される有効量の抗原を含有する水性成分 (C) を含んで調製される W/O エマルションを、乳化剤 (D) および水性成分 (E) を含む液に分散・乳

化させることにより調製されるW/O/W型オイルアジュバントワクチンに、分子量が400～20,000の一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体を、外水相中の含有量が0.5～20重量%となるように添加する、請求項1に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項6】 常温で液状を呈する油性成分(A)が、油相に対して20重量%以上の脂肪酸エステルおよび/またはスクアレンを含有する請求項4または5に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項7】 乳化剤(B)が、HLB10未満の乳化剤である、請求項4または5に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項8】 乳化剤(B)が、多価アルコールと脂肪酸との部分エステル、ポリオキシエチレン鎖を有する非イオン系界面活性剤から選ばれる1種以上を含有する請求項7に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項9】 乳化剤(D)が、HLBが10以上の乳化剤である、請求項4または5に記載のオイルアジュバントワクチン。

【請求項10】 乳化剤(D)が、ポリオキシエチレン鎖を有する非イオン系界面活性剤を含有する請求項9に記載のオイルアジュバントワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、オイルアジュバントワクチンに関する。詳しくは、アジュバント効果に優れ、製剤としての安定性の高いW/O/W型オイルアジュバントワクチンに関する。

【0002】

【従来の技術】

オイルアジュバントワクチンは、古くから効率よく免疫を強化するワクチンとして広く知られている。特にフロイントのアジュバントは、不活化した抗原を用いる場合に非常に有効な免疫増強効果を発揮することから、実験動物に広く用いられている代表的なアジュバントである。しかしながらこのアジュバントは、重度の膿腫や肉芽腫を引き起こす等、強い副作用のため実験室外での使用はほとん

ど行われていない。

【0003】

そこで、このような副作用を軽減し、オイルアジュバントを一般に利用しようとする試みが数多くなされており、その製剤型もフロイントアジュバントと同様のW/O型や、安全性に優れたO/W型、複合型であるW/O/W型等、多岐にわたっている。

【0004】

たとえば、特公平6-81731号公報には、界面活性剤として無水マンニール・オレイン酸エステルを、油分として流動パラフィンを用いたW/O型の油性アジュバントが報告されており、WO91/00107号（特表平4-506521号）公報には、油分として植物油などの代謝可能な油と鉱物油などの代謝不可能な油を混合して用いた低粘度のW/O型油性アジュバントが示されている。

【0005】

また特公平8-32638号公報には、サブミクロン油滴乳剤を含んでなるアジュバント製剤としてO/W型のアジュバントが、さらに特許第2746272号公報には、POP-POEブロックポリマーからなる乳化剤および免疫増強剤としてのグリコペプチドを含むO/W型のワクチンアジュバントが示されている。

【0006】

しかし、このようなアジュバントの中でW/O型オイルアジュバントは高い免疫増強効果が認められる反面、製剤の連続相が油であることから、生体内での拡散、代謝に長期間を要すると共に、接種部位周辺に無菌化膿巣や肉芽腫の形成を引き起こすことも稀ではなく、また接種時に強い疼痛を伴う可能性があるため、生体に直接接種する製剤としてはその使用が制限されてきた。一方、O/W型オイルアジュバントは接種部位に対する局所反応は軽微であり、安全性の面では優れているが、抗原が連続相に含有されているために生体内で速やかに拡散し、十分な有効性が得られにくく、特定の免疫賦活物質が必要である場合が多い。

【0007】

そのため最近ではさらに新しいタイプのオイルアジュバントとしてW/O/W型オイルアジュバントに関する検討も行われている。

たとえば特許第2851422号公報には、注射後、動物の体温により、W/O型に変換するW/O/W型多相乳剤が示されている。しかし、この技術はオイルアジュバントが体内で結果的にW/O型の形態で存在することから、局所反応等の従来のW/O型オイルアジュバントが有していた問題をすべて解決するには至っていない。

【0008】

W/O/W型オイルアジュバントは、複合エマルションの形態をとっているためW/O型やO/W型のオイルアジュバントと比較して製剤としての安定性を維持することが非常に難しい。そのためW/O/W型オイルアジュバントワクチンは、優れたアジュバント活性を発揮するW/O型と、安全性に優れたO/W型のそれぞれの特長を併せ持つことが期待されながら、両者の特性をバランスよく発揮できるオイルアジュバントの開発には依然多くの問題が残されている。

【0009】

本発明者らは、特開平9-268130号公報に、安全性、製剤安定性に優れたW/O型オイルアジュバントワクチンと、さらにそれを水相に分散させることにより得られるW/O/W型オイルアジュバントワクチンを示している。

【0010】

しかし、従来の技術により調製されたW/O/W型オイルアジュバントワクチンは、処方による物性の差が大きく、抗原成分の影響によって粘度が著しく高くなる場合があったり、W/O型オイルアジュバントと比較すると、安定して免疫を誘導することが難しいなどの問題があった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、製剤としての保存安定性や接種部位における局所反応等が改善され、かつ高い免疫効果を発揮する、W/O/W型オイルアジュバントワクチンを提供することを目的とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の目的を達成するため鋭意検討した結果、W/O/W型オイルアジュバントワクチンにおいて、外水相に特定の分子量を有するポリエチレングリコール誘導体を特定量配合することにより、当該W/O/W型オイルアジュバントワクチンが、製剤として高い安定性を有し、局所反応等の安全面で優れと共に、高いアジュバント効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

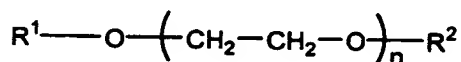
【0013】

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) W/O/W型オイルアジュバントワクチンであって、外水相が分子量400～20,000の下記一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体を0.5～20重量%含有し、且つ内水相が生物学的に許容される有効量の抗原を含有することを特徴とするオイルアジュバントワクチン。

【0014】

【化2】



【0015】

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なっても良く、水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表し、 n は重合度を表す。)

(2) 一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体の分子量が1,000～10,000である、上記(1)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(3) 一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体の外水相中の含有量が1～10重量%である、上記(1)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(4) 常温で液状を呈する油性成分(A)、乳化剤(B)および生物学的に許容される有効量の抗原を含有する水性成分(C)を含んで調製されるW/Oエマルションを、乳化剤(D)および水性成分(E)を含む液に分散・乳化させることにより調製されるW/O/W型オイルアジュバントワクチンであって、当該液が

、分子量が400～20,000の一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体を0.5～20重量%含有する、上記(1)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(5) 常温で液状を呈する油性成分(A)、乳化剤(B)および生物学的に許容される有効量の抗原を含有する水性成分(C)を含んで調製されるW/Oエマルションを、乳化剤(D)および水性成分(E)を含む液に分散・乳化させることにより調製されるW/O/W型オイルアジュバントワクチンに、分子量が400～20,000の一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体を、外水相中の含有量が0.5～20重量%となるように添加する、上記(1)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(6) 常温で液状を呈する油性成分(A)が、油相に対して20重量%以上の脂肪酸エステルおよび/またはスクアレンを含有する上記(4)または(5)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(7) 乳化剤(B)が、HLB10未満の乳化剤である、上記(4)または(5)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(8) 乳化剤(B)が、多価アルコールと脂肪酸との部分エステル、ポリオキシエチレン鎖を有する非イオン系界面活性剤から選ばれる1種以上を含有する上記(7)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(9) 乳化剤(D)が、HLBが10以上の乳化剤である、上記(4)または(5)に記載のオイルアジュバントワクチン。

(10) 乳化剤(D)が、ポリオキシエチレン鎖を有する非イオン系界面活性剤を含有する上記(9)に記載のオイルアジュバントワクチン。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明のオイルアジュバントワクチンは常温で液状を呈する油性成分(A)、乳化剤(B)および生物学的に許容される有効量の抗原を含有する水性成分(C)を含んで調製される(第1工程)W/Oエマルションを、乳化剤(D)および水性成分(E)を含む液に分散・乳化させること(第2工程)により調製され、最終的に得られるW/O/W型オイルアジュバントワクチンの外水相に特定の分

子量を有するポリエチレングリコール誘導体を特定量含有することを特徴とする。

常温で液状を呈する油性成分（A）は、第 1 工程で調製される W/O エマルションにおいては連続相を構成し、第 2 工程を経て得られる W/O/W 型オイルアジュバントワクチンにおいては分散相である油相を構成する。本発明において単に油相という時は、当該 W/O/W 型オイルアジュバントワクチンにおける油相を意味する。この明細書において「常温」とは、15～25℃の範囲内の温度を意味する。常温で液状を呈する油性成分（A）としては、従来、一般的に食品や医薬品、化粧品などに用いられているエステル系油性基剤、あるいは非エステル系油性基剤のうち、常温で液状を示すものから種々選択、使用することができる。

【0017】

常温で液状を示す非エステル系油性基剤としては、たとえば軽質流動パラフィンやスクアレン、スクアラン、ポリブテンなどの炭化水素、カプリル酸やカプリン酸などの中鎖飽和脂肪酸、あるいはオレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの長鎖不飽和脂肪酸などの脂肪酸類や、中鎖あるいは長鎖の脂肪族アルコール類などが挙げられる。また、常温で液状を示すエステル系油性基剤としてはカプリル酸やカプリン酸などの中鎖の飽和脂肪酸やオレイン酸やリノール酸などの長鎖の不飽和脂肪酸とアルコールから誘導される種々の脂肪酸エステルその他、天然由来の脂肪酸エステルであるピーナッツ油、オリーブ油、ヒマワリ油、サフラワー油、ホホバ油などの液状の植物油、あるいは動物由来の液状油であるオレンジラフィー油などが挙げられる。

【0018】

油性成分（A）として、これらのうちから所望により 1 種あるいは 2 種以上を混合して用いる。これらの油性成分の中でも、脂肪酸エステル類、植物油、あるいはスクアレンといった油は、酸化安定性が比較的高いことに加え、生体に対する親和性が高いという長所を有しているので、本発明のオイルアジュバントワクチンに用いる油性成分としてはこれらの油から、1 種あるいは、2 種以上を選択するのが好ましい。特に、脂肪酸エステルとしては生体脂質の構成成分でもある

炭素数 16 から 22 のシス- Δ^9 -不飽和脂肪酸と、炭素数 1 から 3 のアルコールとのエステル化物からなる油性基剤を選択するのが好ましい。

【0019】

さらに脂肪酸エステルおよび／またはスクアレンを、油相中少なくとも 20 重量%以上含有するように用いることによって、最終的に得られるオイルアジュバントワクチンの局所反応等の副作用をより一層軽減し、安全性を向上させることが可能となる。脂肪酸エステルとスクアレンを併用する場合にはその合計量が油相中少なくとも 20 重量%以上となるように含有させればよい。

【0020】

本発明において、オイルアジュバントワクチンを構成する乳化剤 (B) および乳化剤 (D) は、一般に医薬品や食品などに使用されている界面活性剤の中から、生体に対して安定性の高いものを 1 種あるいは 2 種以上を選択して用いることができる。

【0021】

乳化剤 (B) は第 1 工程、すなわち抗原を含有する水性成分 (C) と油性成分 (A) とによって構成される W/O エマルションの調製において使用される。

乳化剤 (B) として用いる界面活性剤としては、最終的に得られる W/O/W 型オイルアジュバントワクチンの安定性を考慮すると親油性のもの、即ち HLB (Hydrophilic-Lipophile Balance: 親水親油バランス) が比較的小さいものが好ましく、特に HLB が 10 未満のものが好ましい。当該乳化剤 (B) は所望により 1 種あるいは 2 種以上を組み合わせて用いることもでき、その場合、全体の HLB が 10 未満となるように当該乳化剤 (B) を選択するのが好ましい。

【0022】

より具体的には、ソルビタン脂肪酸エステル (ソルビタンモノオレート、ソルビタンジオレート、ソルビタンセスキオレートなど) やグリセロール脂肪酸エステル (グリセロールモノオレートなど)、ポリグリセロール脂肪酸エステル (ジグリセロールモノオレート、ジグリセロールジオレートなど) などの多価アルコールと脂肪酸の部分エステルやポリソルベートをはじめとするポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレ

ートなど)、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなど分子内にポリオキシエチレン鎖を有する非イオン系界面活性剤などが用いられる。また、天然のレシチンを含むグリセロリン脂質を使用することもできる。

この中でも特に、ソルビタンやグリセロール、ポリグリセロールのように分子内に3個～10個の水酸基を有する多価アルコールと炭素数12～20の脂肪酸との部分エステルと、ポリオキシエチレン硬化ひまし油に代表されるポリオキシエチレン鎖を付加したヒドロキシ脂肪酸トリグリセライドを全体のHLBが10未満となるよう組み合わせて用いることで、製剤としての安定性がより優れたW/O/W型オイルアジュバントワクチンが調製できる。

【0023】

なお本明細書中では、「HLB」は、W.C.Griffinによって提唱された式(W.C.Griffin, J.Soc.Cosmetic.Chemists, 1, 311(1949)参照)に従って求めている。

【0024】

また、本発明のオイルアジュバントワクチン調製の際、抗原液を含有するW/Oエマルションを構成する成分として、アミノ酸またはその塩および分子内に少なくとも5個の水酸基を有する非還元性の糖または糖アルコールを含有する水溶液と、3個以上の水酸基を有する多価アルコールと脂肪酸との部分エステルで常温で液状を呈する非イオン系界面活性剤とを予め混合してなる乳化剤組成物を上記乳化剤(B)と共に使用することにより、オイルアジュバントの有効性、製剤安定性をさらに高めることが可能である。ここで水溶液として用いるアミノ酸またはその塩と糖または糖アルコールは食品や日本薬局方医薬品、日本薬局方外医薬品として一般に使用されているものの中から選択して使用できる。たとえば、アミノ酸またはその塩としては、グリシン、アラニン、アルギニン塩酸塩、ヒスチジン、フェニルアラニンや、アスパラギン酸ナトリウム、アスパラギン酸カリウム、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウムおよびそれらの水和物などが挙げられ、糖、または糖アルコールとしてはトレハロース、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール、ラクチトールなどが好ましく選択される。

【0025】

上記乳化剤組成物は、上記のアミノ酸またはその塩と上記の糖または糖アルコールを含有する水溶液を調製した後、当該水溶液を上記の非イオン系界面活性剤との重量比が10:1～1:1となるような範囲で混合、攪拌することにより調製される。当該乳化剤組成物は、抗原液を含有するW/Oエマルジョン中、1～20重量%程度、好ましくは2～10重量%程度となるように使用される。

【0026】

乳化剤(D)は第2工程、すなわち上述のW/Oエマルジョンを乳化剤(D)と水性成分(E)を含む液に分散・乳化する工程で使用する。

乳化剤(D)として用いる界面活性剤としては、最終的に得られるW/O/W型オイルアジュバントワクチンの安定性を考慮すると親水性のもの、即ち比較的HLBの大きいものが好ましく、特にHLBが10以上のものが好ましい。当該乳化剤(D)は所望により1種あるいは2種以上を組み合わせる用いることができ、その場合、全体のHLBが10以上となるように当該乳化剤(D)を選択するのが好ましい。

【0027】

より具体的には、ポリソルベート、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなど分子内にポリオキシエチレン鎖を有する非イオン系界面活性剤でHLBが10以上のものが用いられる。また、これらの界面活性剤とソルビタン脂肪酸エステルやグリセロール脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセロール脂肪酸エステルなどの多価アルコールと脂肪酸の部分エステル、天然のレシチンを含むグリセロリン脂質などを組み合わせる使用することも可能である。その中でも特にポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールを単独あるいは他の界面活性剤と組み合わせる使用することで、製剤安定性の優れたW/O/W型オイルアジュバントワクチンを調製することが可能になる。

【0028】

乳化剤(B)または乳化剤(D)として使用するグリセロリン脂質としては、たとえば卵黄や大豆などより抽出、精製されたリン脂質やそれらの水素添加物の

ような天然由来のリン脂質、およびアシル基部分や塩基部分の組成をコントロールした種々の合成リン脂質、リソリン脂質などが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

本発明のW/O/W型オイルアジュバントワクチンにおいて、水性成分（C）は、第1工程で調製されるW/Oエマルションにおいては分散相である水相を構成し、最終的に得られるW/O/W型オイルアジュバントワクチンにおいては分散相である油相中に分散して存在する内水相を構成する。当該水性成分（C）には各種抗原が含有されている。

【 0 0 3 0 】

水性成分（C）に含有させる抗原としては、数多くの種類や形態が挙げられる。より具体的には一般的に用いられている不活化菌体や不活化ウイルス粒子、不活化マイコプラズマなどのほか、サブユニットワクチンで用いられるアタッチメントプロテインやエンベロープ抗原といった病原体の感染防御因子などが挙げられる。不活化菌体の菌としては、例えば、豚アクチノバシラス(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)などのグラム陰性細菌、豚丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopahtiae*)などのグラム陽性細菌などが挙げられる。不活化ウイルス粒子のウイルスとしては、例えば日本脳炎ウイルス(*Japanese encephalitis virus*)などが挙げられる。不活化マイコプラズマのマイコプラズマとしては、豚や鶏などのマイコプラズマが挙げられる。さらに病原体の感染防御因子として、ニューカッスル病ウイルス(*New castle disease virus*)のF蛋白などが挙げられる。また、複数の抗原をもちいたコンバインワクチンとして用いることも可能である。

さらに、本発明のオイルアジュバントワクチンにおいては、抗原に加えて抗生物質などのような抗原以外の薬効成分を配合することも当然可能である。抗生物質の例として硫酸カナマイシン、塩酸オキシテトラサイクリンなどが挙げられる。

抗原の水性成分（C）中の量は、目的や使用する抗原などの種類によって生物学的に許容される有効量が適宜決められる。

【 0 0 3 1 】

本発明において、上記抗原は内水相中に含有されるものであるが、本発明のW/O/W型オイルアジュバントワクチンを調製する過程でその抗原の一部が外水相に漏出した場合も、本発明の効果を損なうものではない。

【0032】

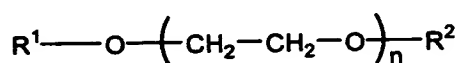
本発明において、水性成分(E)はW/O/W型オイルアジュバントワクチンにおいて外水相を構成する成分である。より具体的には、当該水性成分(E)は、最終的に得られるアジュバントワクチンの安定性と生体安全性を考慮して適宜選択され、例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などが用いられる。

【0033】

本発明において、オイルアジュバントワクチンの外水相に含有させるポリエチレングリコール誘導体は、下記一般式(I)で表される。

【0034】

【化3】



【0035】

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なっても良く、水素原子または炭素数1~4のアルキル基を表し、 n は重合度を表す。)

【0036】

上記一般式(I)において、 R^1 および R^2 の炭素数1~4のアルキル基は、直鎖状または分岐鎖状のいずれでもよく、その具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 sec -ブチル基、 $tert$ -ブチル基が挙げられる。好適な R^1 、 R^2 としては、水素原子、メチル基、エチル基であり、水素原子が特に好適である。 R^1 と R^2 の好適な組み合わせとしては、水素原子と水素原子、水素原子とメチル基、水素原子とエチル基、メチル基とメチル基などが挙げられるが、水素原子と水素原子の組み合わせが特に好適である。 n は重合度で、分子量が400~20,000の範囲内となるような値である。

【0037】

上記一般式(I)のポリエチレングリコール誘導体の分子量は400~20,000であり、好ましくは1,000~10,000、特に好ましくは3,000~9,000である。さらに当該ポリエチレングリコール誘導体の外水相に対する含有量は、0.5~20重量%、好ましくは1~10重量%、更に好ましくは1~5重量%である。

【0038】

ポリエチレングリコール誘導体の分子量が400未満の場合あるいは含有量が0.5重量%未満の場合、十分な粘度低減効果が得られないのに加え、アジュバントとしての効果が弱くなる恐れがある。また、ポリエチレングリコール誘導体の分子量が20,000を越えると、外水相自体の粘度が上昇する為にオイルアジュバントワクチン全体の粘度が上昇し、よって十分な粘度低減効果が得られない。さらに含有量が20重量%を越える場合は、内水相と外水相の浸透圧に大きな差が生じてしまうために安定なW/O/W型のエマルション状態を維持することが困難になり、結果として安定なオイルアジュバントワクチンを調製することができなくなる可能性がある。

【0039】

本発明においては、上記ポリエチレングリコール誘導体の分子量が高くなるほど、外水相の粘度が上昇し、結果として最終的に得られるオイルアジュバントワクチンの粘度が上昇するため、含有させるポリエチレングリコール誘導体の分子量に従って、その含有量を上記範囲内で調整することが望ましい。

【0040】

本発明においては、上記ポリエチレングリコール誘導体のうち、分子量が400~20,000の範囲内において、特定の分子量を有する1種のみを使用してよく、あるいは分子量の異なる2種以上を組み合わせて使用してもよい。

【0041】

最終的に得られるオイルアジュバントワクチンの製剤としての安定性とアジュバント効果を考慮すると、外水相に含有させるポリエチレングリコール誘導体として特に好ましいのは、分子量1000~10,000であり、外水相に対する

濃度は 1 ～ 1 0 重量%、更に好ましくは 1 ～ 5 重量%である。

【 0 0 4 2 】

本発明により調製されるオイルアジュバントワクチンは、アジュバント効果に優れることに加え、外水相中に含有するポリエチレングリコール誘導体により粘度が低減されるという特徴をも有している。一般的に W / O / W 型のエマルションは、内水相に含まれる物質の影響や内水相と外水相の成分の違いにより、粘度が大きく上昇したり、W / O 粒子同士が凝集するなどの現象がしばしば観察される。特にオイルアジュバントワクチンに使用する抗原液には、菌体成分や培地成分などの多様な成分が高濃度に含まれる場合があるため、W / O / W 型オイルアジュバントワクチンの場合には、全く同じ処方でも、用いる抗原液の成分の影響によって、W / O / W 型エマルションの粘度や安定性が大きく変化してしまうことがある。このことは、ワクチンの製造管理上最も避けるべき事象であり、特に複数の抗原種を混合したワクチンを調製する場合には大きな問題となる。しかし、本発明においては、ポリエチレングリコール誘導体を外水相に含有させることにより、処方や内水相の成分に関係なく粘度が低減されるため、そのような問題を大きく改善することが可能である。また、オイルアジュバントワクチンとしての粘度が高いと、生体に投与する際の作業性が悪くなるだけでなく、生体内で拡散性が低下し、注射部位の局所反応や残留性に悪影響を及ぼす可能性もあるが、ポリエチレングリコール誘導体を外水相に配合することで、これらを改善することも可能になる。

【 0 0 4 3 】

また、W / O / W 型オイルアジュバントの特性に影響を及ぼす大きな要因の一つとして、外水相中に分散している W / O エマルションの粒径を挙げることができる。一般に、外水相中に分散する W / O エマルションの粒径が大きくなれば、W / O / W 型オイルアジュバントでありながら、W / O 型オイルアジュバントを接種した場合と同じような挙動が認められ、アジュバント効果は高くなるが、同時に局所反応のような副作用も強くなる。さらに粒子同士の合一が起こりやすく、製剤としての安定性は低くなる。一方、W / O エマルションが比較的小さな粒子である場合は、製剤としての安定性は高くなり、副作用は少ないが、アジュバ

ント効果もまた弱くなる。本発明により調製されるW/O/W型オイルアジュバントワクチンはW/Oエマルション粒子が比較的小さくても、高いアジュバント効果を示すといった特徴を有しており、製剤としての安定性に優れ、副作用が少ないことに加え、有効性の面でも優れたオイルアジュバントワクチンを調製することが可能である。製剤としての安定性と、副作用の軽減の観点から、W/O/W型オイルアジュバントワクチンを構成するW/Oエマルション粒子は、実質上すべてが $50\mu\text{m}$ 以下で、かつ平均粒径が $20\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

【0044】

本発明のオイルアジュバントワクチンの製造方法は特に限定されず、既知の方法に準じて行なうことができる。本発明のオイルアジュバントワクチンを調製する際、第1の工程で調製するW/Oエマルション中の各成分の配合量は、W/Oエマルションに対して、油性成分(A)が30～90重量%、好ましくは40～80重量%、乳化剤(B)が1～20重量%、好ましくは2～15重量%、そして抗原を含む水性成分(C)が5～75重量%、好ましくは15～60重量%の範囲内で調製するのが望ましい。第2の工程で使用する乳化剤(D)の濃度は、乳化剤(D)、水性成分(E)およびポリエチレングリコール誘導体の合計中、0.1～20重量%、好ましくは0.5～10重量%とするのが望ましい。

【0045】

第2工程におけるW/Oエマルション(第1工程で調製される)と、乳化剤(D)と水性成分(E)とを含む液との混合比は、目的あるいは選択する抗原種に応じて適宜選択される。好ましくはW/Oエマルション:乳化剤(D)と水性成分(E)を含む液が、重量比で2:1～1:10、さらに好ましくは2:1～1:5である。

【0046】

本発明において、外水相へのポリエチレングリコール誘導体の添加は、予め上述した分子量が400～20,000の上記一般式(I)で表されるポリエチレングリコール誘導体の一部あるいは全量を、上記の乳化剤(D)と水性成分(E)を含む液に添加することによって、あるいはいったんW/O/W型オイルアジュバントを調製した後、別個に水や生理食塩水または緩衝液などに溶解させた当

該ポリエチレングリコール誘導体を添加することによって行なうことができる。
当該ポリエチレングリコール誘導体の添加量は上述のとおりである。

【 0 0 4 7 】

また、複数の抗原種を混合したオイルアジュバントワクチンを調製する場合には、後述の如く、まず各抗原種毎にそれぞれの抗原を内水相に含むW/Oエマルションを調製し、それらを混合した後、ポリエチレングリコール誘導体、乳化剤（D）および水性成分（E）を含む液に分散させてもよいし、各抗原でW/O/W型オイルアジュバントを調製したのち、混合しても良い。

【 0 0 4 8 】

本発明のオイルアジュバントワクチンには、医薬品として当然のことながら、緩衝化剤や防腐剤、浸透圧調整成分などアジュバント活性には直接関与しない種々の添加剤を含有させることができる。

【 0 0 4 9 】

本発明のオイルアジュバントワクチンの調製に際しては、内水相に抗原を含有したW/Oエマルションを調製する段階（第1工程）、およびW/Oエマルションを乳化剤（D）および水性成分（E）を含む液に分散・乳化させる段階（第2工程）のいずれにおいても、ホモミキサーやホモジナイザー、CLEAR MIX（エム・テクニク（株）製）などの一般的な乳化装置のほか、多孔質膜を利用した膜乳化装置や、高圧ジェット流乳化装置など、一般に乳化が可能な手段であれば、どのような装置でも使用することができる。さらに必要に応じて、メンブランフィルター等を通過させることにより、本発明のオイルアジュバントワクチンを構成するW/Oエマルション粒子の粒径を一定粒径以下に揃えることも可能である。

なお、ワクチンの調製に際して、使用する各成分については、その特性に応じて、あらかじめ加熱滅菌か濾過滅菌などの滅菌処理を行なうこともできる。

【 0 0 5 0 】

また、本発明により調製されたオイルアジュバントワクチンを生体に対して適用する際には、皮下、筋肉、腹腔などへの注射の他、鼻腔や腸管などの粘膜を通した投与方法など、種々の投与経路を目的に応じて選択することができる。また

、生体への投与量ならびに投与回数は所望の免疫効果が得られるべく設定されるべきであり、通常当分野で行なわれている方法に準じて行なうことができる。

【0051】

【実施例】

つぎに、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

本実施例ではポリエチレングリコール誘導体として、ポリエチレングリコール（以下PEG又はマクロゴールと称することもある）を用いた。

【0052】

【オイルアジュバントワクチンの調製】

以下の各実施例で使用したオイルアジュバントワクチンは、いずれもCLEAR MIX CLM-0.8 S [エム・テクニック（株）製]を用いて以下に示す方法で調製した。乳化は室温下で行い、必要に応じて冷却水などを用いた。なお、処方中の各成分は、各々に適した滅菌方法により滅菌処理して使用した。また、攪拌、乳化などの各操作は、すべて無菌環境下にて行った。なお実施例中の「部」は「重量部」を表している。

「オイルアジュバントワクチンの調製」において、「外水相」とはW/O/W型オイルアジュバントワクチンを調製する為にW/Oエマルジョンと混合する液を意味する。

【0053】

《実施例1：ワクチン1の調製》

表1のW/O-1の組成に基づき、ビーカー中に抗原液以外の各成分をはかりとった。なお、ポリオキシエチレン硬化ひまし油は50℃に加温、溶解して使用し、グルタミン酸ナトリウム、ソルビトール水溶液はソルビタンセスキオレートと1/1重量比で混合、攪拌した後添加した。処方中の残りのソルビタンセスキオレートはそのまま添加した。これに抗原液を攪拌しながら徐々に加え、常温にて、CLEAR MIX CLM-0.8 S [エム・テクニック（株）製]を用いて、12,000rpmで5分間攪拌混合し、W/O型エマルジョン（W/O-1）を調製した。

【0054】

次に、表3の外水相1の組成に従い、各成分をリン酸緩衝生理食塩水(PBS, Phosphate Buffered Saline, pH7.4)に溶解した(外水相1)。ビーカー中に、上記W/O-1を1部と外水相1を1部はかりとり、CLEAR MIX CLM-0.8Sを用いて9,000rpmで5分間混合して、オイルアジュバントワクチン1を調製した。なお、以下の実施例、比較例のワクチン調製において、W/Oエマルションと外水相との混合は、特に方法を規定したものを除いて、すべて実施例1と同じ攪拌条件で行った。

【0055】

《実施例2：ワクチン2の調製》

実施例1で調製したW/O型エマルション(W/O-1)を1部と、表3の外水相2の組成に従って調製した外水相2を1部はかりとり、オイルアジュバントワクチン2を調製した。

【0056】

《実施例3：ワクチン3の調製》

表1のW/O-2の組成に基づき、ビーカー中に抗原液以外の各成分をはかりとった。なお、ポリオキシエチレン硬化ひまし油は50℃に加温、溶解して使用し、日本薬局方マクロゴール6000はあらかじめ抗原液に均一に溶解した。実施例1と同様の条件でW/O型エマルションを調製した(W/O-2)。

次に、W/O-2を3部と、表3の外水相3の組成に従って調製した外水相3を2部はかりとり、オイルアジュバントワクチン3を調製した。

【0057】

《実施例4：ワクチン4の調製》

表3の外水相4の組成に従って各成分をはかりとった。約60℃に加温し、十分に混合、分散したものを室温まで冷却し、外水相4として使用した。次に、実施例3で調製したW/O型エマルション(W/O-2)を1部と、外水相4を3部はかりとり、オイルアジュバントワクチン4を調製した。

【0058】

《実施例5：ワクチン5の調製》

表 1 の W / O - 3 の組成に基づき、ビーカー中に抗原液以外の各成分をはかりとった。実施例 1 と同様に、抗原液を攪拌しながら徐々に加え、実施例 1 と同様に W / O 型エマルション (W / O - 3) を調製した。

次に、この W / O 型エマルション (W / O - 3) を 2 部と外水相 2 を 3 部ビーカー中にはかりとり、オイルアジュバントワクチン 5 を調製した。

【 0 0 5 9 】

《実施例 6 : ワクチン 6 の調製》

実施例 5 で調製した W / O 型エマルション (W / O - 3) を 2 部と、表 4 の外水相 5 の組成に従って調製した外水相 5 を 2 部はかりとり、CLEAR MIX CLM - 0 . 8 S を用いて、9, 0 0 0 r p m、5 分間混合、乳化した後、1 0 重量 % となるよう P B S に溶解した日本薬局方マクロゴール 6 0 0 0 溶液 1 部を添加して軽く混合し、オイルアジュバントワクチン 6 を調製した。

【 0 0 6 0 】

《実施例 7 : ワクチン 7 の調製》

表 2 の W / O - 4 の組成に基づき、ビーカー中に抗原液以外の各成分をはかりとり、CLEAR MIX CLM - 0 . 8 S を用いて、実施例 1 と同様に W / O 型エマルションを調製した (W / O - 4) 。

次に、W / O - 4 を 1 部と、表 3 の外水相 4 の組成に従って調製した外水相 4 を 1 部はかりとり、オイルアジュバントワクチン 7 を調製した。

【 0 0 6 1 】

《実施例 8 : ワクチン 8 の調製》

表 2 の W / O - 5 の組成に基づき、ビーカー中に抗原液以外の各成分をはかりとった。なお、ポリオキシエチレン硬化ひまし油は 6 0 ° C に加温、溶解して使用した。抗原液を攪拌しながら徐々に加え、実施例 1 と同様に W / O 型エマルションを調製した (W / O - 5) 。

次に、この W / O 型エマルション (W / O - 5) を 1 部と外水相 2 を 1 部はかりとり、オイルアジュバントワクチン 8 を調製した。

【 0 0 6 2 】

《実施例 9 : ワクチン 9 の調製》

表 2 の W / O - 6 の組成に基づき、ピーカー中に抗原液以外の各成分をはかりとった。なお、卵黄レシチンは油相に均一に溶解し、ポリオキシエチレン硬化ひまし油は 6 0 ° C に加温して、溶解した後使用した。抗原液を攪拌しながら徐々に加え、実施例 1 と同様に W / O 型エマルジョンを調製した (W / O - 6) 。

次に、この W / O 型エマルジョン (W / O - 6) を 3 部と外水相 3 を 2 部はかりとり、オイルアジュバントワクチン 9 を調製した。

【 0 0 6 3 】

《比較例 1 : ワクチン 1 0 の調製》

実施例 1 で調製した W / O - 1 の 1 部と、表 4 に示した外水相 5 の 1 部をはかりとり、オイルアジュバントワクチン 1 0 を調製した。

【 0 0 6 4 】

《比較例 2 : ワクチン 1 1 の調製》

実施例 1 で調製した W / O - 1 の 1 部と、表 4 に示した外水相 6 の 1 部をはかりとり、オイルアジュバントワクチン 1 1 を調製した。

【 0 0 6 5 】

《比較例 3 : ワクチン 1 2 の調製》

実施例 3 で調製した W / O - 2 の 3 部と、表 4 に示した外水相 7 の 2 部をはかりとり、オイルアジュバントワクチン 1 2 を調製した。

【 0 0 6 6 】

《比較例 4 : ワクチン 1 3 の調製》

実施例 5 で調製した W / O - 3 の 2 部と、表 4 に示した外水相 5 の 3 部をはかりとり、オイルアジュバントワクチン 1 3 を調製した。

【 0 0 6 7 】

《比較例 5 : ワクチン 1 4 の調製》

実施例 7 で調製した W / O - 4 の 1 部と、表 4 に示した外水相 8 の 1 部をはかりとり、オイルアジュバントワクチン 1 4 を調製した。

【 0 0 6 8 】

《比較例 6 : ワクチン 1 5 の調製》

実施例 8 で調製した W / O - 5 の 1 部と、表 4 に示した外水相 6 の 1 部をはか

りとり、オイルアジュバントワクチン 1 5 を調製した。

【 0 0 6 9 】

《比較例 7 : ワクチン 1 6 の調製》

実施例 9 で調製した W / O - 6 の 3 部と、表 4 に示した外水相 7 の 2 部をはかりとり、オイルアジュバントワクチン 1 6 を調製した。

【 0 0 7 0 】

なお、実施例、比較例の各ワクチンに使用した W / O エマルションの組成を表 1、2 に、外水相の組成を表 3、4 に、そして各ワクチンにおける W / O エマルションと外水相の配合割合を表 5 にそれぞれまとめて記載した。

【 0 0 7 1 】

【表 1】

W/Oエマルジョンの組成 1

化合物名	配 合 成 分			配 合 比 率 (重 量 %)		
	W/O-1	W/O-2	W/O-3	W/O-1	W/O-2	W/O-3
エチルオレート	40	-	-	40	-	-
スクアレン	-	55	20	-	55	20
精製大豆油	-	-	15	-	-	15
ソルビタンセスキオレート	10	10	10	10	10	10
ポリオキシエチレン(20) 硬化ひまし油 ^{*1)}	-	-	5	-	-	5
ポリオキシエチレン(40) 硬化ひまし油 ^{*1)}	5	3	-	5	3	-
ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノオレート ^{*1)}	-	2	-	-	2	-
グルタミン酸ナトリウム、ソルビトール水溶液 ²⁾	5	-	-	5	-	-
抗原液	40	29	50	40	29	50
日本薬局方マクロゴール 6000 ³⁾	-	1	-	-	1	-
合 計	100	100	100	100	100	100

*1) ()内の数字はエチレンオキシドの平均付加モル数を表す。

*2) 25g のグルタミン酸ナトリウム 1 水和物と 10g のソルビトールを蒸留水に溶解し最終的に 100mL となるように調整した水溶液。

*3) マクロゴールはあらかじめ抗原液に溶解した。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

W/Oエマルションの組成 2		配合比率 (重量%)			
化合物名	配 合 成 分	W/O-4	W/O-5	W/O-6	
オレイルオレート		40	-	30	
スクアレン		-	-	20	
イソプロピルミリステート		-	60	-	
精製卵黄レシチン		-	-	2	
グリセロールモノオレート		15	10	8	
ポリオキシエチレン(10) 硬化ひまし油 ^{*1)}		5	5	-	
ポリオキシエチレン(60) 硬化ひまし油 ^{*1)}		-	5	5	
抗原液		40	20	35	
合 計		100	100	100	

*1) ()内の数字はエチレンオキシサイドの平均付加モル数を表す。

【0073】

【表 3】

オイルアジュバントワクチンの外水相の組成 (1)					
化合物名	配 合 成 分	配合比率 (%)			
		外水相 1	外水相 2	外水相 3	外水相 4
ポリオキシエチレン(60) 硬化ひまし油 ^{*1)}		2	-	-	2
ポリオキシエチレン(20) ソルピタンモノオレート ^{*1)}		-	-	2	-
ポリオキシエチレン(196) ポリオキシプロピレン(67)		1	3	-	-
グリコール ^{*1)}		-	-	-	-
精製卵黄レシチン		-	-	-	2
マクロゴール 1000 ^{*2)}		-	-	-	1
日本薬局方マクロゴール 4000		-	4	1	-
日本薬局方マクロゴール 6000		3	-	1	-
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)		94	93	96	95
合計		100	100	100	100

*1) () 内の数字はアルキレンオキシサイドの平均付加モル数を表す。

*2) 医薬品添加物規格適合品

【 0 0 7 4 】

【表 4】

オイルアジュバントワクシンの外水相の組成 (2)

化合物名	配 合 成 分	配合比率(%)					
		外水相 5	外水相 6	外水相 7	外水相 8	外水相 8	外水相 8
ポリオキシエチレン(60) 硬化ひまし油 ^{*1)}		2	-	-	-	2	2
ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノオレート ^{*1)}		-	-	2	-	-	-
ポリオキシエチレン(196) ポリオキシプロピレン(67)		1	3	-	-	-	-
グリコール ^{*1)}		-	-	-	-	2	2
精製卵黄レシチン		-	-	-	-	-	-
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)		97	97	98	98	96	96
合 計		100	100	100	100	100	100

*1) () 内の数字はアルキレンオキシサイドの平均付加モル数を表す。

【 0 0 7 5 】

【表 5】

各ワクチン調製に使用した W/O エマルジョンおよび外水相とそれらの配合量

ワクチン No.		W/O エマルジョン	外水相
実施例	ワクチン 1	W/O-1/1 部	外水相 1/1 部
	ワクチン 2	W/O-1/1 部	外水相 2/1 部
	ワクチン 3	W/O-2/3 部	外水相 3/2 部
	ワクチン 4	W/O-2/1 部	外水相 4/3 部
	ワクチン 5	W/O-3/2 部	外水相 2/3 部
	ワクチン 6	W/O-3/2 部	外水相 5/2 部 マクロゴール溶液/1 部 ^{*1)}
	ワクチン 7	W/O-4/1 部	外水相 4/1 部
	ワクチン 8	W/O-5/1 部	外水相 2/1 部
	ワクチン 9	W/O-6/3 部	外水相 3/2 部
比較例	ワクチン 10	W/O-1/1 部	外水相 5/1 部
	ワクチン 11	W/O-1/1 部	外水相 6/1 部
	ワクチン 12	W/O-2/3 部	外水相 7/2 部
	ワクチン 13	W/O-3/2 部	外水相 5/3 部
	ワクチン 14	W/O-4/1 部	外水相 8/1 部
	ワクチン 15	W/O-5/1 部	外水相 6/1 部
	ワクチン 16	W/O-6/3 部	外水相 7/2 部

*1) 調製方法の詳細は、明細書本文の実施例 6 参照。

【 0 0 7 6 】

〔免疫試験〕

次に実際に種々の抗原を含有するオイルアジュバントワクチンについて、免疫試験を行った。各試験例中で用いているワクチンの記号は、そのワクチンが、前記実施例および比較例の各々の記号に対応した処方に基づいて調製されたものであることを示している。

【 0 0 7 7 】

《試験例 1：豚丹毒（E r）不活化ワクチン》

Erysipelothrix rhusiopahtiae S E - 9 株 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION) を 5 % 牛血清加ブレインハートインフュージョンブロス (B H I B) にて培養し、ホルマリンで不活化したものを抗原とし、ワクチン 1、3、5、7、10、12、14 を調製した。調製に際しては、各ワクチン中の抗原量が 5.0×1

0.8 CFU/ml となるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて適宜抗原濃度を調整した。また、各ワクチンについて抗原液の代わりに PBS を用いたプラセボを調製し、それぞれのワクチンに対応するプラセボを用いて希釈し、5倍希釈系列を作成した。また、対照としてフロイントのインコンプリートアジュバント (IFA)、IFA の内水相に PEG 1000 を 5% 添加 (対内水相) したアジュバント (IFA-PEG) および水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして用いたワクチンについても調製した。

【0078】

各ワクチン (あるいは希釈ワクチン) を 1 群 5 匹の 5 週齢クリーンマウスの内股部皮下に 0.25 ml/匹 で接種した。免疫 3 週間後に、Er Fujisawa 株 (社団法人動物用生物学的製剤協会) を $2.2 \times 10^6 \text{ CFU/0.1 ml}$ の量で各マウスに内股部皮下注射し、注射後 10 日間生死を観察し、50% 生存ワクチン希釈倍数 (PD_{50}) を算出した。また免疫 2 週間後に、ワクチン原液および 5 倍希釈ワクチンを接種したマウス (各処方につき計 10 匹) について注射局所の触診を行って硬結の程度を調べた。硬結の程度は 5 段階でスコア化し (0 ; 無し、1 ; 軽度 ~ 4 ; 重度)、各処方についてその平均値を算出した。

【0079】

さらに、今回調製した W/O/W 型オイルアジュバントワクチンの平均粒径をレーザー回折式粒度分布測定装置 SALD-2100 (島津製作所 (株) 製) により測定した。

【0080】

有効性の結果 (PD_{50}) について表 6 にまとめた。

【0081】

【表 6】

試験例 1 : 豚丹毒 マウス免疫試験結果									
	試験成績 (耐過匹数/試験匹数)								PD ₅₀ (倍)
	原液	×5	×25	×125	×625	×3125	×15625		
免疫群	ワクチン 1	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	2660.4
	ワクチン 3	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	1397.5
	ワクチン 5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	1928.2
	ワクチン 7	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
比較免疫群	ワクチン 10	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	532.1
	ワクチン 12	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	1/5	0/5	385.7
	ワクチン 14	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	279.5
	IFA	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3670.7
	IFA-PEG	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
	アルミゲル	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	77.1

【0082】

結果は希釈ワクチン（またはワクチン原液）を接種したマウスの耐過匹数およびPD₅₀値で示した。ここでPD₅₀値は、50%生存ワクチン希釈倍数として表してあるため、大きなPD₅₀値を与えるワクチンほど有効性が高い。免疫群のワクチン1、3、5、7接種群はいずれも、1300以上のPD₅₀を示し、IFAと遜色ない優れた有効性を示した。一方、比較免疫群のワクチン10、12、14およびアルミゲルアジュバントではPD₅₀が各々532.1、385.7、279.5、77.1であり、本発明により調製されたワクチンのPD₅₀値が有意

に高い値であることがわかる。これらの結果より、本発明により調製されたワクチンの有効性が非常に優れていることが示された。

【0083】

次に、注射局所の触診結果（硬結の程度の確認）およびW/O/W型オイルアジュバントワクチンの平均粒径を表7に示す。

【0084】

【表7】

試験例 1：豚丹毒 マウス注射局所反応			
		注射局所反応 (平均)	平均粒径 (μm)
免疫群	ワクチン 1	0.1	6.8
	ワクチン 3	0.2	8.1
	ワクチン 5	0	7.2
	ワクチン 7	0.2	7.9
比較免疫群	ワクチン 10	0.3	7.5
	ワクチン 12	0.2	8.5
	ワクチン 14	0.8	8.8
	IFA	3.8	—
	IFA-PEG	3.2	—
	アルミゲル	0	—

注射局所反応スコア (0；無し、1；軽度～4；重度)

【0085】

免疫群では注射局所の反応はほとんど観察されず、いずれも高い安全性を示しており、平均粒径は6.8～8.1と20 μm 以下であった。一方、比較免疫群のW/O/W型オイルアジュバントワクチンの平均粒径もほぼ同等であり、IFAおよびIFA-PEGを除く比較免疫群の注射局所の反応も小さかった。しかし、IFAおよびIFA-PEG注射群のマウスにおいては重度の硬結が見られ、非常に高い反応スコアとなり、IFA、IFA-PEGを接種したマウスのうち、約4分の3以上のマウスが歩行障害をきたしていた。

【0086】

以上の成績は、本発明のオイルアジュバントワクチンが優れた有効性を発揮することに加え、注射局所の反応はアルミゲルワクチンと同様に極めて軽微であり

、非常に高い安全性を示すことを証明するものである。

【0087】

《試験例2：豚マイコプラズマ感染症不活化ワクチン》

豚血清添加BHL培地にて培養した Mycoplasma hyopneumoniae 92-28株（野外症例より分離された株；財団法人化学及血清療法研究所）ホルマリン不活化菌体を用いて、ワクチン2、4、6、11、13を調製した。調製に際しては各ワクチン中の抗原量が 8.0×10^8 CCU/ml となるようリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いて適宜抗原濃度を調整した。さらに水酸化アルミニウムゲル（Superfos社製、ALHYDROGEL 85、アルミニウム換算9mg/ml）をアジュバントとして使用したワクチン（ワクチンAL）と、水酸化アルミニウムゲルに日本薬局方マクロゴール4000を最終濃度4%となるように添加したワクチン（ワクチンAL-PEG）を同濃度の抗原を含有するように調製した。

【0088】

各ワクチンを2ml/頭の量で1群8頭のSPF (Specific Pathogen Free) 豚（初回免疫時4週齢）の頸部筋肉内に2週間隔で2回接種した。2回目免疫1週間後に Mycoplasma hyopneumoniae 92-28株（野外症例より分離された株；財団法人化学及血清療法研究所）感染豚由来肺乳剤（ 3×10^6 CCU/6ml/頭）を気管内に投与し、投与4週間後に解剖し、肺病変を観察した。それぞれの肺病変をスコア化し、非免疫対照豚の病変に対する各ワクチンの病変減少率（%）を算出した。

結果を表8に示す。

【0089】

【表 8】

試験例 2：豚マイコプラズマ感染症 豚免疫試験結果										
	免疫群			比較免疫群						
	ワクチン 2	ワクチン 4	ワクチン 6	ワクチン 11	ワクチン 13	ワクチン AL	ワクチン AL-PEG	非免疫 対照		
病変スコア (各個体)	0 1.5 0.5 16.2 2.6 9.2 3.5 19.6 6.6	0 2.0 9.6 30.2 5.5 16.3 1.5 10.5 9.5	0 0 3.6 5.8 18.6 20.6 9.6 10.2 8.6	15.2 0.5 9.1 4.5 14.2 23.0 38.6 10.2 14.4	16.4 5.5 22.0 4.58 19.5 23.3 36.2 14.4 17.7	23.6 15.2 5.5 19.6 56.3 12.4 28.4 30 23.9	50.2 16.5 22.1 25.9 30.6 11.1 9.1 30 24.4	5.5 11.8 14.5 32.7 15.9 40.2 25.5 45.5 24.0		
(平均)										
病変減少率 (%)	72.3	60.5	64.3	39.8	26.0	0.3	-2.0	—		

【0090】

ワクチン 2、4、6 を接種した免疫群はいずれも病変減少率が 60 % を上回り、優れた有効性を示した。PEG を二次乳化後に添加したワクチン 6 についても他の免疫群とほとんど同様の効果が認められた。一方、比較免疫群であるワクチン 11、13 は、病変減少率がそれぞれ 39.8 %、26.0 % にとどまり、さらにアルミゲルワクチンは PEG 添加の有無に関わらず、ワクチンによる病変の

軽減が全く認められなかった。

【0091】

以上の成績は、マイコプラズマを抗原とした場合においても、本発明のオイルアジュバントワクチンが優れた効果を有することを証明するものであり、さらに外水相へのPEGの添加が二次乳化前後のいずれであっても有効であることを示すものである。

【0092】

〔エマルションの粘度測定〕

次に、調製したW/O/W型オイルアジュバントワクチンについて、粘度測定を行った。測定には前述の試験例1で調製した豚丹毒(Erysipelothrix rhusiopathiae)ワクチン(ワクチン1、3、5、7、10、12、14)に加え、同一抗原液処方で比較できるように当該豚丹毒を同様に抗原として用いて、ワクチン2、4、6、8、9、11、13、15、16の各処方に従って調製した各種ワクチンについても測定を行った。また粘度の測定は、ワクチン調製1週間後に、E型回転粘度計〔東機産業(株)製、RE105H型〕を用いて、25℃で実施した。結果を表9に示す。

【0093】

【表 9】

調製ワクチンの粘度		
ワクチン No.		粘 度 (mPa·s, 25℃)
実施例	ワクチン 1	33
	ワクチン 2	28
	ワクチン 3	42
	ワクチン 4	35
	ワクチン 5	31
	ワクチン 6	32
	ワクチン 7	38
	ワクチン 8	45
	ワクチン 9	29
比較例	ワクチン 10	153
	ワクチン 11	161
	ワクチン 12	206
	ワクチン 13	187
	ワクチン 14	470
	ワクチン 15	396
	ワクチン 16	315

【0094】

粘度測定の結果、表 9 示したように、実施例のワクチンは 25℃における粘度がすべて 50 mPa·s 以下であり、非常に低粘度で容易に注射可能であったのに対し、比較例のワクチンは 150 mPa·s 以上の粘度を示し、注射の際にかなり強い力と時間を要した。

【0095】

以上の結果は、本発明の W/O/W 型オイルアジュバントワクチンが、外水相にポリエチレングリコール誘導体を含有させることによって、その粘度が大きく低減することを示したものであり、ワクチンの投与に関して大幅な省力化が可能であることを示すものである。

【0096】

[エマルションの内包率測定]

次に、調製したW/O/W型オイルアジュバントワクチンについて、内包率の測定を行った。測定には、前述の試験例2で使用した豚マイコプラズマワクチン（ワクチン2、4、6、11、13）に加え、同一抗原液処方で比較できるように当該マイコプラズマを同様に抗原として用い、ワクチン1、3、5、7、8、9、10、12、14、15、16の各処方に従って調製した各種ワクチンについても測定を行った。調製したワクチンは、PBSで希釈後、遠心分離によりエマルション部分と外水相を分離、採取し、外水相中のタンパク量を測定した。また、W/Oエマルション調製の際に添加した抗原液（内水相を構成する）中のタンパク量から外水相中のタンパク量を差し引いて内水相中に保持されているタンパク量を求め、以下の式に従って内包率を算出した。

【0097】

【数1】

$$\text{内包率 (\%)} = \frac{\text{添加した抗原液中のタンパク量} - \text{外水相中のタンパク量}}{\text{添加した抗原液中のタンパク量}}$$

【0098】

ワクチンは調製後4℃に保管し、内包率の測定は、ワクチン調製の翌日と3ヶ月後に実施した。

内包率の測定結果を表10に示す。

【0099】

【表 1 0】

調製ワクチンの内包率		内包率 (%)	
		調製翌日	調製 3 ヶ月後
実施例	ワクチン 1	98	97
	ワクチン 2	98	98
	ワクチン 3	93	90
	ワクチン 4	94	92
	ワクチン 5	93	93
	ワクチン 6	92	90
	ワクチン 7	94	92
	ワクチン 8	97	97
	ワクチン 9	92	89
比較例	ワクチン 10	97	95
	ワクチン 11	98	98
	ワクチン 12	81	71
	ワクチン 13	91	90
	ワクチン 14	96	96
	ワクチン 15	94	94
	ワクチン 16	87	85

【0 1 0 0】

実施例、比較例共に、調製翌日および調製 3 ヶ月後において 7 0 % 以上の高い内包率を示し、優れた安定性を有していた。特に実施例の各ワクチンは、表 9 に示したような非常に低い粘度でありながら、優れたタンパクの内包率を示した。

【0 1 0 1】

以上の結果は、本発明の W / O / W 型オイルアジュバントワクチンが、粘度が大きく低減されているにも関わらず、高い安定性を有することを証明するものである。

【0 1 0 2】

前述の表 6 ~ 表 1 0 の結果から明らかなように、本発明のオイルアジュバントワクチンは、W / O 型オイルアジュバントの特徴である優れた有効性と、O / W 型オイルアジュバントの特徴である優れた安全性を共にバランスよく発揮するワ

クチンであることがわかる。さらにW/O/W型オイルアジュバントワクチンの外水相に特定のポリエチレングリコール誘導体を含むという本発明の技術により、内水相に含有する成分の影響を受けず、しかも安定性を損なうことなく、粘度が低減された作業性に優れた有用なオイルアジュバントワクチンが調製できることがわかる。

【0103】

【発明の効果】

本発明のW/O/W型オイルアジュバントワクチンは、高いアジュバント効果を発揮すると共に、局所反応等の副作用が軽減され、且つ製剤安定性に優れている。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 外水相が分子量 4 0 0 ~ 2 0 , 0 0 0 のポリエチレングリコール誘導体を 0 . 5 ~ 2 0 重量%含有し、且つ内水相が生物学的に許容される有効量の抗原を含有することを特徴とする W / O / W 型オイルアジュバントワクチンの提供。

【効果】 外水相に特定の分子量を有するポリエチレングリコール誘導体を含有させることによって、高いアジュバント効果を発揮すると共に、局所反応等の副作用が軽減され、且つ粘度が低減された作業性、製剤安定性に優れた W / O / W 型オイルアジュバントワクチンを調製し得る。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173555]

1. 変更年月日	1996年 3月 4日
[変更理由]	住所変更
住 所	熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
氏 名	財団法人化学及血清療法研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 4 3 4 1]

1. 変更年月日 1 9 9 4 年 1 1 月 9 日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 3 号
氏 名 日本油脂株式会社